

## 2013 年南京市甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因的进化分析

何敏,石利民,王燕,王璇,乔梦凯,丁洁\*

(南京市疾病预防控制中心微生物检验科,江苏 南京 210003)

**[摘要]** 目的:调查 2013 年南京地区新型甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶(NA)基因的分子特征,了解 NA 基因的变异情况,分析 NA 基因进化特征。方法:提取 18 株新型 H1N1 流感病毒基因组 RNA,RT-PCR 扩增 NA 基因,测序并分析其遗传进化特征和重要功能位点。结果:2013 年南京分离株与国内外推荐疫苗株 NA 基因高度同源,序列相似性达 98.2%以上。18 株分离株在进化树上分为 2 支,与国内疫苗株接近,与国际疫苗株存在一定的遗传距离;与国内外疫苗株相比,多个位点氨基酸发生变异;1 株分离株的酶活性位点 119 位发生了变异;部分分离株糖基化位点也出现了增加和缺失的现象。结论:南京市 2013 年流行株与国内外疫苗株 NA 基因同源性仍然较高,疫苗依然有效。2013 年后期的甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶基因累积了更多的变异,需加强监测。

**[关键词]** 流感病毒;NA 基因;遗传进化;突变

**[中图分类号]** R511.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)12-1783-06

doi:10.7655/NYDXBNS20141248

## Evolution analysis of NA genes of influenza A(H1N1) virus in Nanjing in 2013

He Min, Shi Liming, Wang Yan, Wang Xuan, Qiao Mengkai, Ding Jie\*

(Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the genetic variations and evolution characteristics of neuraminidase (NA) gene of the novel influenza A (H1N1) virus isolated from Nanjing in 2013. **Methods:** Viral RNA was extracted from 18 strains of the novel influenza A (H1N1) virus. NA genes were amplified by RT-PCR and then sequenced. The genetic variations and important functional sites of NA genes were analyzed. **Results:** Compared with recommended vaccine strain in and abroad, the homology of NA amino acid sequences between 18 Nanjing isolates and vaccine strains was above 98.2%. The isolates were grouped into two clusters, with some genetic distance by phylogenetic mapping with the WHO vaccine strain, while closer to the domestic vaccine strain. Compared to the vaccine strains, the variations of amino acids occurred in different sites; 1 isolate had a E119K replacement in enzymatically active site; Glycosylation sites appeared to be increased or deleted in the 2013 isolates. **Conclusion:** High homology was observed in all the NA genes between the strains isolated from Nanjing in 2013 and vaccine strains. The vaccine can continue provide a protection. However, more mutations were accumulated in NA genes in the strains isolated in the late of 2013. Therefore, the monitoring should be strengthened.

**[Key words]** influenza virus; NA; genetic evolution; variation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1783-1788]

2009 年在墨西哥发生了新型 H1N1 甲型流感的暴发疫情,随即疫情迅速在全球范围内蔓延,给人类公共卫生和社会发展造成了重大影响。在疫情有所缓解之后,该型 H1N1 取代了原有的季节

性 H1N1 流感病毒,与 H3N2 共同成为流行的优势株<sup>[1-2]</sup>。该型病毒是基因重配所致,包含猪流感、禽流感和人流感 3 种流感病毒基因片段,其中以细胞膜蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的基因尤为重要,易发生变异<sup>[3-4]</sup>。NA 是流感病毒表面重要的糖蛋白,其头部具有水解酶的活性,能促使病毒从宿主细胞表面释放,感染新的细胞,且 NA 是流感病毒的主要表面抗原之一,

**[基金项目]** 南京医学科技发展课题(QYK11137)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yu2an2002@yahoo.com.cn

可发生持续不断的变异,直接或间接导致病毒对神经氨酸酶抑制剂(NAI)类药物耐药;同时NA的抗原漂变也会对现用疫苗的免疫效果产生一定影响<sup>[5]</sup>。因此,为了监测甲型H1N1流感NA基因的变异情况,及时发现具有流行病学意义的耐药株,本研究随机选取2013年流感监测样中的甲型H1N1核酸阳性样本进行病毒分离,扩增NA基因并测序,共计18株,对其相关功能位点和同源性进行分析,了解其遗传进化特征和变异情况,为今后流感的监控和防治提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2013年南京3家流感监测哨点医院(南京鼓楼医院、南京儿童医院、南京市第一医院)流感疑似患者咽拭子标本共3186份,其中核酸检测甲型H1N1阳性标本共84份。

狗肾传代细胞(MDCK,国家流感中心提供、

本实验室保存);DMEM培养基、青链霉素、胎牛血清(Gibico公司,美国);TPCK胰酶(Sigma公司,美国);RNeasy Mini kit、One step RT-PCR kit(QIAGEN公司,德国);PCR扩增仪(ABI公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 流感病毒的分离和鉴定

随机选取18个甲型H1N1阳性咽拭子样本,经MDCK细胞分离培养,HA、HI鉴定为甲型H1N1流感病毒。具体参见《流行性感病毒》WS285-2008执行。

#### 1.2.2 引物设计与合成

运用PSQ Assay Design软件分析NA基因特征,分别设计分段引物NA-1、NA-2和NA-3。NA-1扩增1~600 bp,NA-2扩增536~1063 bp,NA-3扩增941~1452 bp。所扩增的产物涵盖所研究的位点。引物序列见表1。引物序列由上海英骏公司合成。测序引物为通用引物M13。

表1 NA基因片段扩增引物

Table 1 RT-PCR primers of NA

引物名称	引物序列(5'→3')	目的基因	产物长度(bp)
NA-1-F0	TGTA AAAACGACGGCCAGTAGCAAAAAGCAGGAGT	NA	601
NA-1-R600	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGGCCRGAAATTCC		
NA-2-F536	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGTCAGCAAGTCTTGATGA	NA	528
NA-2-R1063	CAGGAAACAGCTATGACCCGTATYTGAATGAAAAYC		
NA-3-F941	TGTA AAAACGACGGCCAGTTAGGATACATCTGCAGTGG	NA	512
NA-3-R1452	CAGGAAACAGCTATGACCAGTAGAAACAAGGAG		

#### 1.2.3 病毒RNA的提取、扩增和测序

吸取200 μl病毒培养液,利用Qiagen RNeasy Mini kit提取病毒RNA,以提取的病毒RNA为模板,采用Qiagen One Step RT-PCR Kit进行RT-PCR扩增。RT-PCR反应条件为:60℃ 1 min,42℃ 20 min,50℃ 20 min,95℃ 15 min;PCR:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 10 min。取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。相关操作均按照试剂盒说明书进行。扩增产物送南京金斯瑞生物有限公司进行纯化和测序。

#### 1.2.4 基因测序及序列分析

采用Dnastar软件包中的SeqMan软件对测序结果进行拼接,获得甲型H1N1流感病毒的NA基因全长序列。将获得的序列与2013年WHO推荐疫苗株A/California/07/2009(H1N1)和国内疫苗株A/Shanghai-Putuo/SWL1203/2013比较,利用MegAlign程序进行同源性分析;利用MEGA(5.2)

软件中邻接法(neighbor-joining)绘制NA基因系统进化树,同时对NA蛋白的抗原决定簇、酶活性位点和糖基化位点的变异情况进行分析。

## 2 结果

### 2.1 流感病毒流行情况及分析

2013年1~12月共检测监测样本3186份咽拭子标本,流感病毒阳性标本339份,阳性率为10.64%。上半年流行株以甲型H1N1为主,H3型次之;下半年流行株逐渐转变为以H3型为主,甲型H1N1次之。流感流行主要集中在冬春季,11月和12月达到高峰(图1)。本实验分别在本年度冬春流行高峰期及夏季偶发期随机选取甲型H1N1流感病毒阳性标本共18份进行病毒分离,其中包括1~3月9份,4~9月5份,10~12月4份。

### 2.2 同源性分析和基因进化树分析

对所分离的甲型H1N1毒株进行NA基因扩

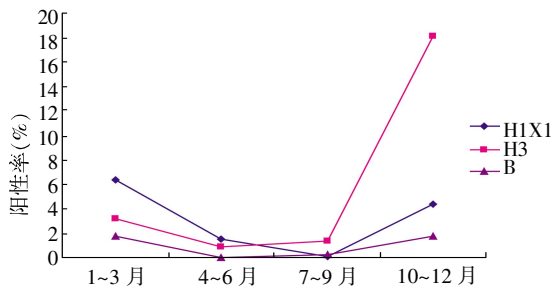


图 1 2013 年南京市流感监测样本阳性率的时间分布  
Figure 1 Time distribution of the positive rate of monitoring influenza samples of Nanjing in 2013

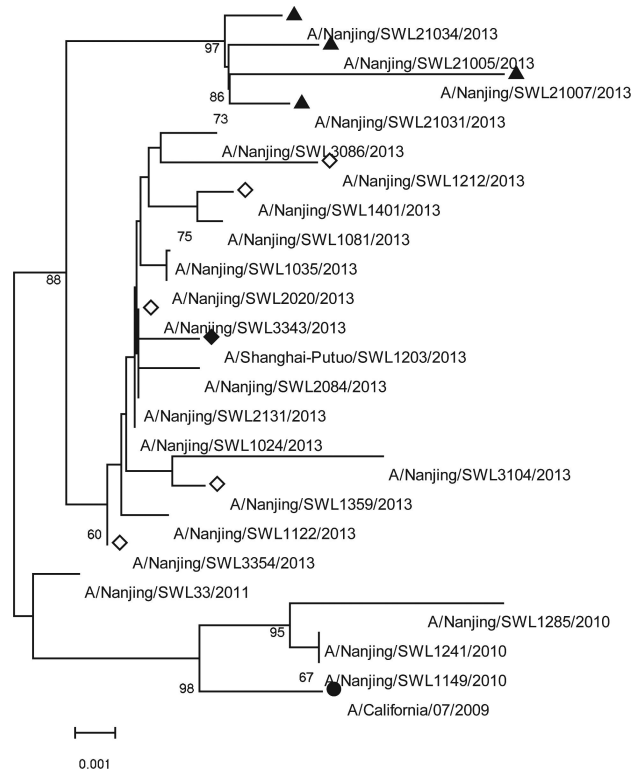
增和测序。18 株甲型 H1N1 流感病毒株 NA 基因 ORF 全长均为 1 407 bp, 编码 469 个氨基酸, 均未发现核苷酸的插入与丢失现象。利用 MegAlign 软件进行同源性分析, 所有 2013 年分离株之间 NA 基因序列保持了高度的同源性, 为 98.5%~99.8%; 与 2013 年国际疫苗株相比, NA 基因序列的同源性为 98.2%~99.0%, 与国内疫苗株相比, NA 基因序列的同源性为 98.6%~99.8%。

利用 Mega 5.2 软件对 18 株分离株的 NA 基因序列与 2013 年国内外疫苗株及南京 2010 年、2011 年新型甲型 H1N1 分离株 (2013 年国内疫苗株、2010 年 1 月份 3 株、2011 年 2 月份 1 株序列均由国家流感中心提供) 进行种系分析。从图 2 可以看出, 毒株在进化树中的分布基本上是按照时间顺序, 进化的大体方向是分别沿主干斜长型向上发展。同年度毒株的同源性最高, 随时间推移, 同源性逐渐降低。2009~2011 年的毒株聚集在一个大的分支上, 2010 年毒株更接近于 2009 年毒株。2013 年度流行株独立构成了一个大的分支, 与国际疫苗株处于不同分支上, 亲缘关系相对较远; 国内代表株位于分支内, 亲缘关系更近。2013 年度大分支内又分成了 2 个分支, 2013 年冬季 4 株分离株单独构成了 1 个小分支, 相对于国内疫苗株和 2013 年之前的分离株产生了一些进化。

### 2.3 NA 的分子特征分析

#### 2.3.1 突变位点

相对于国内外疫苗株, 2013 年南京分离株存在多个位点的变异。与 2013 年国内疫苗株相同, 18 株 H1N1 分离株均发生 N44S、N200S、V241I、N248D、Y351F 和 N369K 的突变。此外, 夏季出现 1 株 I34V 突变, 冬季 4 株都发生了 I34V 突变。其余突变包括 S286N(2/18)、I314M(1/18)、I321V(4/18)、S366F(1/18)、N386K(4/18) 和 K432E(4/18), 且这些变异



●: 2013 年 WHO 推荐疫苗株; ◆: 2013 年国内疫苗株; ◇: 2013 年夏季偶发期流行株; ▲: 2013 年冬季流行株。

图 2 2013 年南京市甲型 H1N1 流感病毒分离株 NA 基因系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of NA genes of novel Influenza

大多发生在 2013 冬季流行株中。突变位点见表 2。

#### 2.3.2 酶活性位点

NA 蛋白的酶活性位点包括 8 个催化位点 (R118、D151、R152、R224、E276、R292、R371、Y406) 和 11 个辅助位点 (E119、R156、W178、S179、D/N198、I222、E227、H274、E277、N294、E425)<sup>[4]</sup>。与疫苗株相比, 除了 1 株 A/Nanjing/SWL2084/2013 有 E119K 突变外, 没有发生其他耐药位点突变(表 2)。

#### 2.3.3 糖基化位点

经 NetNGlyc 1.0 Server 分析, 2013 年度南京流行的甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因的糖基化位点稳定在 9 个, 国内疫苗株一致。除了保留了原有的 8 个糖基化位点外, 即第 50(NQS)、58(NNT)、63(NQT)、68(NIS)、88(NSS)、146(NGT)、235(NGS)、386(NFS)位, 增加了第 42 位糖基化位点(NQS); 有 3 株分离株增加了第 437 位新的糖基化位点(NGS)。同时, 2013 年分离株毒株也出现了糖基化位点的缺失现象, 2013 年春季分离株中有 1 株出现第 50 位(NQS)的缺失, 2013 年冬季 4 株分离株都出现了第 386(NFS)位的缺失(表 3)。

表2 18株南京分离株NA蛋白酶活性位点变异情况  
Table 2 Amino acid variations of neuraminidase in 18 isolates of Nanjing

毒株名称	氨基酸位点													
	34	44	119	200	241	248	286	314	321	351	366	369	386	432
A/California/07/2009	I	N	E	N	V	N	S	I	I	Y	S	N	N	K
A/Shanghai-Putuo/SWL1203		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL1024/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL1035/2013		S		S	I	D	N			F		K		
A/Nanjing/SWL1081/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL1122/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL2020/2013		S		S	I	D	N			F		K		
A/Nanjing/SWL2084/2013		S	K	S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL2131/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL3086/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL3104/2013		S		S	I	D				F	F	K		
A/Nanjing/SWL1212/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL1359/2013	V	S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL1401/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL3343/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL3354/2013		S		S	I	D				F		K		
A/Nanjing/SWL2005/2013	V	S		S	I	D			V	F		K	K	E
A/Nanjing/SWL2007/2013	V	S		S	I	D		M	V	F		K	K	E
A/Nanjing/SWL2031/2013	V	S		S	I	D			V	F		K	K	E
A/Nanjing/SWL2034/2013	V	S		S	I	D			V	F	F	K	K	E

A/Nanjing/SWL1024~A/Nanjing/SWL3104: 1~3月流行株; A/Nanjing/SWL1212~A/Nanjing/SWL3354: 4~9月流行株; A/Nanjing/SWL2005~A/Nanjing/SWL2034: 10~12月流行株。

表3 18株南京分离株NA蛋白糖基化位点变异情况  
Table 3 Amino acid variations of neuraminidase in 18 isolates of Nanjing

毒株名称	氨基酸位点									
	42	50	58	63	68	88	146	235	386	437
A/California/07/2009		NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Shanghai-Putuo/SWL1203	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL1024/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	NGS
A/Nanjing/SWL1035/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL1081/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL1122/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	NGS
A/Nanjing/SWL2020/2013	NQS	deletion	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL2084/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL2131/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	NGS
A/Nanjing/SWL3086/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL3104/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL1212/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL1359/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL1401/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL3343/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL3354/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	NFS	
A/Nanjing/SWL2005/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	deletion	
A/Nanjing/SWL2007/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	deletion	
A/Nanjing/SWL2031/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	deletion	
A/Nanjing/SWL2034/2013	NQS	NQS	NNT	NQT	NIS	NSS	NGT	NGS	deletion	

N型糖基化位点的序列为N-X-T/S, 其中N: 天冬酰胺; T: 苏氨酸; S: 丝氨酸; X: 代表任意氨基酸。A/Nanjing/SWL1024~A/Nanjing/SWL3104: 1~3月流行株; A/Nanjing/SWL1212~A/Nanjing/SWL3354: 4~9月流行株; A/Nanjing/SWL2005~A/Nanjing/SWL2034: 10~12月流行株。

### 3 讨 论

本研究主要对 2013 年度南京市分离的 18 株甲型 H1N1 流感病毒的 NA 基因序列的同源性、进化特征及相关功能位点进行了分析。以 WHO 推荐的 2013 年国际疫苗株 A/California/7/2009 和 2013 年国内疫苗株 A/Shanghai-Putuo/SWL1203/2013 为对照。所有南京分离株与疫苗株的核苷酸同源性均在 98.2% 以上,仍保持高度同源性,提示疫苗对南京市甲型 H1N1 流感预防效果仍较理想。

进化树分析表明,同一年度的国内外疫苗推荐株中,国内疫苗株与 2013 年南京分离株显示了更高的亲缘性,提示 NA 基因存在一定的地区差异。分析表明,毒株间存在年代差异,年代相隔越长,序列差异越大。越早的病毒在进化树中的位置离国际代表株越近。虽然后期的甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因累积了更多的变异,但所有毒株之间基因同源性均较高,未发生大的变异。值得注意的是,2013 年后期分离的甲型流感病毒 NA 基因在进化树上与国内外疫苗株均存在一定距离;且已经出现较多氨基酸位点的变异,一旦这种点突变不断累积,将会出现抗原位点构型变化,而逃离人群特异性免疫屏障,可能导致大流行的发生。这要求我们进一步密切监测其抗原性变异情况,为免疫策略和流感防控工作及时提供科学依据。

关于 N1 亚型 NA 的抗原位点目前尚无定论,不同研究的说法不一。有研究认为,NA 蛋白 N 端第 140~157 位氨基酸很有可能是抗原决定簇位点所在<sup>[6]</sup>。分析 18 株流感病毒的氨基酸序列分析发现, L140、N141、D142、H144、S145、N146、G147、T148、D151、R152、S153、P154、R156 等 13 个位点未发生改变。表 2 显示 18 株分离株的 NA 基因仍有多个位点发生变异,其中 I34V、I321V、Y351、N386K、432E 是 2013 年流行株新发的位点变异,与 2013 年国内代表株一致。值得注意的是, N386K、K432E 等变异在 2013 年下半年流行突然增多,并迅速成为优势株。依据 Faming、Maurer-Stroh 等<sup>[7-8]</sup>研究, N386K、K432E 等部分变异位点位于抗原决定簇上。出现抗原位点的变异,提示必须加强季节性流感病原学监测,及时掌握病毒的变异情况。此外,南京 18 株分离株与国际疫苗株相比都有一个 N248D 的突变,这与日本学者对 2009 年甲型 H1N1 大流行期日本毒株的研究结果一致,认为这是区分最早期毒株和高峰期毒株最重要的非同义突变<sup>[9]</sup>。

NA 蛋白的酶活性位点直接或间接参与了酶的催化作用,一旦有氨基酸发生突变,就可能对 NA 酶活性产生影响,降低流感病毒对 NA 抑制剂的敏感性,导致对 NA 抑制剂的耐药<sup>[10]</sup>。H274Y 突变是近年来季节性 H1N1 病毒产生对磷酸奥司他韦(达菲)耐药性的主要分子机制。目前国内外许多地区已陆续报道 H274Y 突变株出现对达菲的耐药,并且与药物使用无关的聚集性耐药毒株开始增加<sup>[11-12]</sup>。本次研究分析表明,南京未发生甲型 H1N1 的 H274Y 耐药株,所有毒株 NA 基因所有改变均未涉及酶活性位点的变化。仅在 1 株 A/Nanjing/SWL2084/2103 (H1N1) 分离株中出现了 E119K 有效位点的突变,但 E119K 突变对耐药性影响有待进一步研究。分析结果表明 2013 年南京分离株 NA 基因的酶活性中心及周围相关位点氨基酸仍高度保守,神经氨酸酶抑制剂对其是敏感的,相关位点可以作为抗流感药物研发的基因靶点。

糖基化位点的增加或减少对病毒的抗原性及其生物学特性具有一定影响,是决定流感病毒感染性和致病性的重要因素<sup>[13-14]</sup>。研究结果表明,2013 年度南京流行株糖基化位点与国内代表株一致稳定在 9 个;与国际疫苗株相比,增加了第 42 位糖基化位点;有 3 株分离株增加了第 437 位新的糖基化位点(NGS)。病毒在进化中会获得新的糖基化位点,这些新积累的糖基化位点可能会掩盖抗原位点,成为病毒逃避宿主免疫压力的另一种方式<sup>[15]</sup>。同时,糖基化在稳定 NA 蛋白的结构和生理功能过程中起到重要作用,而 2013 年底 4 株分离株集体出现了第 386(NFS)位的缺失。这些改变可能导致了病毒性质的改变。

本研究初步分析了 2013 年南京地区甲型 H1N1 流感病毒 NA 基因的遗传进化和分子特征,研究发现 2013 年度分离株在基因进化、潜在抗原位点、酶活性位点和糖基化位点上均发生了变异。面对随时都可能出现的耐药性和抗原漂变,应加强病毒流行亚型、耐药性及其相关基因遗传进化的监测。

#### [参考文献]

- [1] 苏文哲,柯昌文. 流行性感冒病毒的耐药性相关研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(3): 171-176
- [2] 陈恩品, 缪小兰, 邵 洁, 等. 2009~2010 年无锡市流行性感冒监测分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2011, 31(11): 1710-1712
- [3] Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans[J].

- N Engl J Med, 2009, 360(25):2605-2615
- [4] 吴静,丁勇,刘成友. 甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因的简单重复序列预测[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(1):42-47
- [5] 李钧,邵铁娟,于新芬,等. 2009~2011 年杭州地区甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶基因的遗传进化分析[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(10):830-834
- [6] 苏彤,李淑华,常文军,等. 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒神经氨酸酶基因进化分析[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(6):618-621
- [7] Fanning TG, Reid AH, Taubenberger JK. Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions[J]. Virology, 2000, 276(2):417-423
- [8] Maurer-Stroh S, Ma J, Lee RT, et al. Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites[J]. Biol Direct, 2009, 4(1):18
- [9] Morlighem JE, Aoki S, Kishima M, et al. Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic[J]. PLoS One, 2011, 6(4):e18956
- [10] Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance[J]. J Clin Virol, 2008, 41(1):13-19
- [11] Altland K, Benson MD, Costello CE, et al. Genetic microheterogeneity of human transthyretin detected by IEF[J]. Electrophoresis, 2007, 28(12):2053-2064
- [12] 苏彤,李淑华,鹿文英,等. 一株新型甲型 H1N1 流感病毒 H275Y 的奥司他韦耐药变异分析[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(12):1412-1418
- [13] Liu M, Chen H, Luo F, et al. Deletion of N-glycosylation sites of hepatitis C virus envelope protein E1 enhances specific cellular and humoral immune responses[J]. Vaccine, 2007, 25(36):6572-6580
- [14] 刘倜,林艺,张圣洋,等. 山东省甲型 H1N1 流感病毒病原学及基因特性研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(3):224-230
- [15] Abe Y, Takashita E, Sugawara K, et al. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin[J]. J Virol, 2004, 78(18):9605-9611
- [16] 范云燕,刘海燕,石健,等. 2008~2009 年南宁市人季节性 H1N1 流感病毒神经氨酸酶潜在的抗原位点和抑制剂耐药位点分析[J]. 华南预防医学, 2012, 38(5):6-10

[收稿日期] 2014-04-11

(上接第 1752 页)

在争议。Park 等<sup>[4]</sup>认为保留盆腔自主神经的根治性子宫切除术(NSRH)有可能降低根治性。本研究 40 例例行 LNSRH, 术后测量宫旁组织切除长度、阴道切除长度, 并与 LRH 组相比较, 两组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明 LNSRH 并未降低早期宫颈癌的根治性, 因而是可行的。

Frumovitz 等<sup>[5]</sup>认为早期宫颈癌患者宫旁转移的可能性很低(不到 1%), 且肿瘤直径  $< 2$  cm 的患者基本不会转移。本研究中随访 2~45 个月无局部复发及远处转移, LNSRH 组与 LRH 组相比术中出血、术后复发率方面无统计学意义, 说明 LNSRH 在早期宫颈癌治疗中是安全的。

## [参考文献]

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010:263
- [2] 梁志清. 子宫颈癌腹腔镜保留神经广泛子宫切除术的

模式程序选择及技巧[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(4):1364-1366

- [3] Liang Z, Chen Y, Xu H, et al. Laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy with fascia space dissection technique for cervical cancer: description of technique and outcomes[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(2):202-207
- [4] Park NY, Chong GO, Hong DG, et al. Oncologic results and surgical morbidity of laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy in the treatment of FIGO stage IB cervical cancer: long-term follow-up[J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(2):355-362
- [5] Frumovitz M, Sun CC, Schmeler KM, et al. Parametrial involvement radical hysterectomy specimens for women with early stage cervical cancer[J]. Obstet Gynecol, 2009, 114(1):93-99

[收稿日期] 2014-04-17